

⑫ 公表特許公報 (A)

平5-509417

⑬ 公表 平成5年(1993)12月22日

⑭ Int. Cl.^{*}
G 02 B 21/06
G 01 N 21/84

識別記号

厅内整理番号
8106-2K
9115-2J審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 6 (2)

(全 5 頁)

⑮ 発明の名称 共焦点走査光学顕微鏡

⑯ 特 願 平3-512239
⑰ 出 願 平3(1991)7月16日

⑮ 説明文提出日 平5(1993)1月18日

⑯ 国際出願 PCT/GB91/01176

⑰ 國際公開番号 WO92/01966

⑯ 國際公開日 平4(1992)2月6日

優先権主張 ⑮ 1990年7月18日イギリス(GB)⑯ 9015793.4

⑮ 発明者 エイモス、ウイリアム・ブラッドショー
⑯ 出願人 メディカル・リサーチ・カウンシル⑮ 代理人 弁理士 深見 久郎 外3名
⑯ 指定国 A T(広域特許), B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), U S請求の範囲

1. 共焦点走査光学顕微鏡であって、

- 光学走査システムと、

- 走査システムを通して後、テスト中の標本が照射のエレメントの2つ以上の別個のかつ分離した複数の走査されるよう、任に異なるスペクトル成分のおよび異なる配向の2つ以上の入力ビームを同時に発生するための手段と、

- 走査手段によるデスキャンの後、2つ以上の出力ビームをそれぞれ受けるための2つ以上の検出器とを含み、各々の検出器は照射されたエレメントの領域のうちの1つから導出された出力光に実質的に固定される出力ビームを受ける、顕微鏡。

2. 2つ以上のビームは励起波長は異なるが発光波長は同一である2つ以上の顕微鏡チャネルを規定する、請求項1に記載の顕微鏡。

3. 2つ以上のビームは励起波長は同一だが発光波長は異なる2つ以上の顕微鏡チャネルを規定する、請求項1に記載の顕微鏡。

4. 2つ以上のビームは異なる励起波長と異なる発光波長とを有する2つ以上の顕微鏡チャネルを規定する、請求項1に記載の顕微鏡。

5. 各エレメントの領域からの発光は検出器へと狭く停止共焦点開口へ個々に別々に通過し、各々の領域について少

なくとも1つの開口および検出器が存在する、請求項1ないし4のいずれかに記載の顕微鏡。

6. エレメントの領域はスポットまたはバーの形である、請求項1に記載の顕微鏡。

7. バーはスリットの像によって発生するスリット走査共焦点顕微鏡である、請求項6に記載の顕微鏡。

8. 入力ビームは互いにに対して小角度で設定される、請求項1ないし7のいずれかに記載の顕微鏡。

9. 入力ビームは多ラインレーザからの光を分割することによって得られる、請求項1ないし8のいずれかに記載の顕微鏡。

10. ビームスプリッタが出力ビームの分離のために設けられる、請求項1ないし9のいずれかに記載の顕微鏡。

11. 出力ビームを波長ごとに分離することは1つ以上の波長選択性フィルタによって促進される、請求項1ないし9のいずれかに記載の顕微鏡。

12. 別個の入力ビームは多波長ビームをプリズムで透過させることによって得られる、請求項1ないし11のいずれかに記載の顕微鏡。

13. 異なる走査されたエレメントの領域に関する経路時間の差は電子的に補償される、請求項1ないし12のいずれかに記載の顕微鏡。

特表平5-509417 (2)

明細書

発明の名称 共焦点走査光学顕微鏡

発明の分野

この発明は光学共焦点走査顕微鏡に関する。

発明の背景

英國特許公報第1 111 111号は、特に螢光または反射標本の研究のための共焦点走査光学顕微鏡を示す。この機器は標本上の走査されたスポットに光の焦点を合わせることに依存し、その照射されたスポットはデスキャンの後検出器前部の共焦点開口上に結像される。

像が標本からの螢光で形成される場合は、標本に配向された光の波長は螢光を励起させるような方法で選択される。放たれた光は適当なビームスプリッタによって、励起する光から分離され、かつ検出器が蛍光によって発せられた光にのみ応答するような方法で波長選択性フィルタを通して。この設計に基づく機器は商業的に入手可能である。それらは適当なビームスプリッタおよびフィルタによって、放たれた光を異なる波長域のビームに組み分ける装置(111 111)を含む。この分割の後、2つの検出器で識別可能な異なる螢光色を発する2つの染料が用いられる。代替的に、容認された光学の実務に従って、適当なビームスプリッタの使用により螢光像と同時に反射像が得られる。

先行技術の機器は満足に作用するが、一走査スポットの使用に依存するすべての共焦点走査顕微鏡は、システムのすべての分光選択性が発せられたまたは反射されたビーム

を異なる波長の部分に分離することにあるという欠点を有する。もし2つの染料の螢光発光スペクトル間にかなりの重複があれば、それらは識別することができない。たとえば、バカラ社(Bacaral)は、1984年プレナム・プレス(Plenum Press)出版の「共焦点顕微鏡使用法ハンドブック(The Handbook of Confocal Microscopy)」において、通常使用されている染料フルオレセインおよびロードミンはこの形式のシステムでは効果的に分離できないとコメントしている。許容可能な分離を達成するために、励起の波長を変化させることが必要である。これはある種類のレーザ光をスペクトル的に異なる特性の他の種類に変化させることにより得られる。まずある種類の励起でシステムを動作することにより像が得られ、それから異なる種類の励起ビームで第2の像が得られる。この動作は速度が遅く面倒である。

アムラ、オデおよび日本ゲワ(Avila, Ode and Japan Gowa)は、赤、緑および青レーザビームが標本上で独立的に走査され、かつ反射されたビームはダイクロイックフィルタによって分離され、かつその各自は3つの分離した直線CCD検出器アレイの1つ上で走査動作を実行する顕微鏡を記述した。この記述はSPIE国際光学技術学会(1987)の予稿集181号53-60頁に発表された。原則として、アムラ他システムは螢光顕微鏡として使用され得る。それからこれは1種類以上の染料が各ライン走査の間

に迅速に連続して励起することを許容するであろう。しかしながら、2つの染料が同一の発光スペクトルを有する場合、または1つのレシオメトリック染料の発光スペクトルが单一波長でモニタされるべき場合は、アムラ他システムはホワイト(white) (英國特許出願番号第1 184 3211号)のものに対して有利な点がない、なぜならどちらのシステムも2つの発光信号を分離できないからである。

発明

この発明に従って、共焦点走査光学顕微鏡が提供され、これは

-光学走査システムと、

-走査システムを通過した後、テスト中の標本が照射のエレメントの2つ以上の別個のカット分離した領域で走査されるように、任意に異なるスペクトル成分および異なる配向の2つ以上の入力ビームを同時に発生するための手段と、さらに

-走査手段によるデスキャンの後、2つ以上の出力ビームをそれぞれ受けるための2つ以上の検出器を含み、各々の検出器は照射されたエレメントの領域のうちの1つから導出された出力光に実質的に限定される出力ビームを受ける。

この発明は容認された実務に従って、可能な励起像の像の測定を行なうために、励起波長が異なるが発光波長は同一である2つ以上の顕微鏡チャネルを考慮する。

この発明はまた容認された実務に従って、可能な発光率の像の測定を行なうために、励起波長は同一だが発光波長は異なる2つ以上の顕微鏡チャネルを考慮する。

この発明はこうして多くの種類の走査光学顕微鏡に適用可能である。これは、走査システムの各掃引の間に2つ以上のスペクトル的に別個の励起スポットまたはバーが標本上で共に走査されることが可能な手段を提供する。各スポットからの発光は、検出器へと既く静止共焦点開口へ個々に別々に通過し、各スポットについて少なくとも1つの開口および検出器が存在する。

標本の螢光または反射のために各スポットから発せられたビームは、確立された実務に従って検出器の間でスペクトル的にろ過されるかもしれないが細分化されてもよく、または検出器へ非選択的に通過させてもよい。したがって一走査サイクルで、各々の像が励起および発光周波数の両方ににおいて他の像と異なり得る2つ以上の完全な像を得ることが可能である。

この発明は「多言化光学システム」と考えられてよい、なぜならそれは同一の走査システムおよび対物レンズを通過する独立しているが平行に近いビーム経路の2つ以上の組を含むからであり、光学経路は共に折り畳まれているという意味どおりに多言化されている。

実施例の説明

この発明のさらなる特徴および利点が図面を参照

报表平5-509417 (3)

して以下の実施例の説明から明らかとなるであろう、その開拓は

図1はこの発明の多重化光学システムを組入れる共焦点
走査顕微鏡の概略図であり、

図2は図1の上部についての代表的かつ好ましい光学的配置を示す略略図であり、さらに

図3は異なるスペクトル特性を有するいくつかのビームがそれによって一つの（たとえば多ライン）レーザから得られる、この発明での使用のための光学手段を示す概略図である。

図図を参照して、この発明は、拡張された発光ビーム経路を有するレーザ共焦点走査顕微鏡において多数の独立した光学チャネルが励起のために同時に使用されることを許容する光学アセンブリを提供するが、この複数の取扱統への応用に限定はされない。この発明は光のバーまたはスリットが根本上で走査される共焦点顕微鏡、および一つのスポットが走査される共焦点顕微鏡に用いられることが可能である。

図1において、図面を単純にするために2つの独立した光経路のみが示されるが、実際ではその数についての制限はない。

2つのレーザー 1 および L 2 からの異なるスペクトル特性を有する光は、ビームスプリッタ BS 1 上に向けられる。2つのビームは互いに対してもうずかに角度があり、その角

度は明確さのために図中では誇張される。2つのビームは示されるように走査システム中に反射され、それは四方のビームの角走査を同時に生じる。ビームの角分離は走査鏡を通じて維持され、典型的には接線レンズBおよび対物レンズDの適当な屈折鏡光学系を通過した後、標本上で2つの別個の移動する光のスポットS₁およびS₂の形成を結果として生じる。

反射または螢光のためにS1で標本から光が免せられ、この免せられた光の一部は光学システムを通過して戻り、デスキャン、つまり走査システムによって静止ピームへ再変換され、ピームスプリッタBS1を通過し、かつ検出器D1へと続く共焦点鏡口A1上に落ちる。S2からの光は類似しているが別個の経路に沿って光学システムを通過し、検出器D2上に落ちる。好みしい角分離は光学チャネルの端足のいく分離と両立して可能な限り小さい。イメージリストレーションを許容するために、S1とS2とに対応するスポットによって標本中の所与のポイントを走査する間の時間の偏差は、適当な慣用的電子手段、たとえばイメージ処理ソフトウェアによって補償され得る。2つ以上のスポットが同一の走査線上にあるべきであるということはこのシステムの概念にとって本質的ではない。

図2の好ましい実例において、走臺位置および微細鏡は図中で示されないが、図1のものと同一であると考えられるべきである。レーザー1およびレーザー2からのビームは小

さな角度で再びビームスプリッタ BS 1 上へ通過する。ビームスプリッタ BS 1 を通過した後に戻ってくるビームは、第2のビームスプリッタ BS 1 へと通過し、それは二色性特性を有し、その結果一方のビーム B 1 の光の大半は共焦点開口 A 1 へと、それから検出器 D 1 へと通過し、一方他方のビーム B 2 は A 2 より D 2 へと優先的に反射される。この修正は、発光周波数の選択を達成するために第2のビームスプリッタ BS 2 の使用を許容するので好まれ、かつまた既存の機器をわずかに修正するだけで実現され得る。尚せられたビームを波長ごとに分離することは、波長選択性フィルタ F 1 や F 2 を加えることにより改良され得る。

各々が適切な開口 A 1 または A 2 上へと向かう発光ビームの照度は、BS 2 と検出器 D 1 または D 2 との間に置かれた鏡（図示せず）の使用によって便利に速成され得る。

付加的鏡および二色性反射器は、入力ビーム L1 と L2 との間に適切な角度を設ける便利な手段を与える。たとえば、図 3 はそれにより 1 つのダラインレーザからの光が異なるスペクトル成分および角度を有するビームに分離され得る、多くの可能な手段のうちの 1 つを図示する。

この場合、ガラスまたは他の透明材料の調節が平行のブロック B が使用されて、波長に従ってビームの小さな傾方向の分離を生じる。ビーム間の角度はそれからビームをブリズム P を通過させることによって調節され、そこでビーム

ムはプリズムの分散力のために異なる角偏差を受ける。プリズムの適切な配向によって、各々一周波数に対応する平行ビームが発生し、それらはビームスプリッタBS1に向かって収束する。収束の角度はプリズムの角度とその屈折率および分散力によって決定される。図中で実線Sはより短い波長のビームを示し、それはより長い波長の光に対する卓越性で元されるビームよりもよく用折する。

これまで定義されたこの発明の範囲内で、上に説明された
が示された配置のさまざまな修正が可能である。

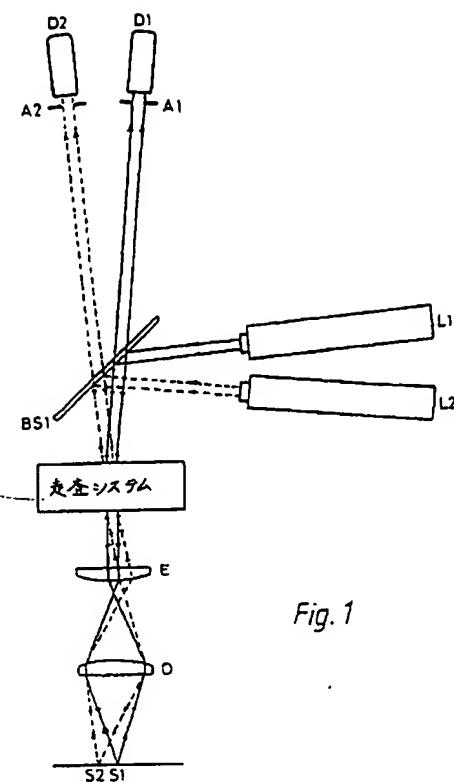


Fig. 1

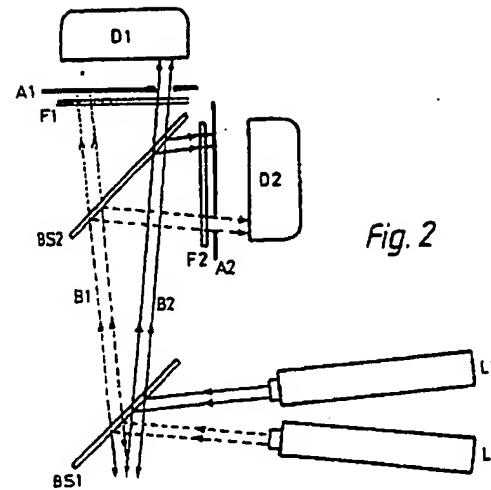


Fig. 2

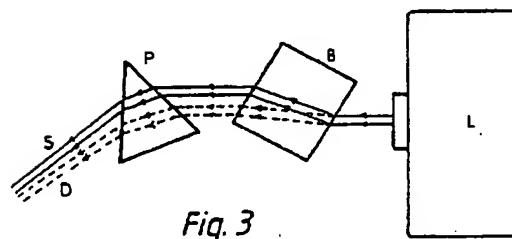


Fig. 3

要約

テスト中の標本が屈折の割合のスポットまたはスリット (S1, S2) で同時に走査され、かつ反射または螢光のために標本から発せられた2つの出力ビームがデスキャンされて別々の静止共焦点開口 (A1, A2) および検出器 (D1, D2) へと通過する、共焦点走査光学顕微鏡である。

国際調査報告		International Application No. 93/091174
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (or general characterisation of the invention)		
Apparatus or instrument for examining objects by means of coherent monochromatic light (IPC Int.C1.5 G 02 B 21/00 G 01 N 21/04)		
II. FIELD SEARCHED		
Machinery specially adapted for examining documents		
Classification System		
Int.C1.5	G 02 B	G 01 N
Other classification symbols or codes applied for examination		
Cooperating classifier and classification symbols applied for examination		
in the earlier view and classification symbols applied in the prior document		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*		
Category / Country of origin, title and substance, where applicable, of each cited passage //		Reference to Class No.//
A	US-A-3928812 (D.M. KOLLM) 11 November 1975; see abstract; figures 2,3; column 4, line 82 - column 6, line 40	1,3,12
A	GB-A-2184821 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 12 June 1987; see the whole document (cited in the application)	1
A	DE-A-3431860 (JENOPTIK JENA) 3 May 1989; see the whole document	1
A	US-A-4893009 (Y. MORIKAWA) 9 January 1990; see column 1, lines 5-9; column 2, lines 29-45; column 3, lines 67 - column 7, line 44; figures 3-5	1,4,5,7 10,11
*/ Indication whether cited document is:		
-/- Original disclosure of the present invention		
-/- Document relating to the present state of the art which is not essential to determine the technical problem to be solved		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved, in so far as it concerns only the performance data of certain elements or their assembly or of other features which do not contribute to solving the main problem		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved, in so far as it concerns only the combination or separate use of certain elements		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved, in so far as it concerns only the shape, relative position and/or color of certain elements		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved, in so far as it concerns only the manner or way of performing a known process		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved, in so far as it concerns only the apparatus for performing a known process		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved, in so far as it concerns only the details of a known device		
-/- Document which is not essential to determine the technical problem to be solved, in so far as it concerns only the details of a known process		
IV. CLASSIFICATION		
Date of the first examination of the international application		Date of mailing of the International Search Report
10-10-1993		13.11.
International Searching Authority		European Patent Office
Name of the Inventor(s) (see front page)		
Hans-Dieter FRANK		

INFORMATION LISTED IN THE PCT/CN 91/01176 CONTINUED FROM THE SECOND SHEET		Document No.
Category	Content of Document, ref. indication, name, description, if any, shown therein	Document or Class No.
A	Cytometry, volume 3, no. 4, 1982 (US) J.A. Steinke et al.: "Fluorescence measurements on single cells excited at three laser wavelengths", pages 225-233; see figures 1-3; page 227 - page 228, column 2, line 16	1,2,4-7 10,11
A	US-A-4284897 (I. SAMOURA) 10 August 1981; see the whole document	1,10,11

国際検索報告

CN 9101176
SA 49452

This document lists the relevant search documents relating to the patent application cited in the International Search Report.
This document can be consulted in the European Patent Office (EPO) file no. 911176.
The European Patent Office is not responsible for patent performance, validity and novelty, given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publishing date	Patent family number(s)	Publishing year
US-A- 3918812	13-11-75	AL-A- 6854174 BE-A- 814460 CA-A- 1010234 DE-A- 2447016 FR-A, B 2229263 GB-A- 1644785 JP-A- 50016397	06-11-75 02-09-74 01-11-77 28-11-74 05-12-74 09-09-75 01-02-75
US-A- 2184321	17-06-87	None
DE-A- 3031880	03-05-86	None
US-A- 4893008	09-01-90	JP-A- 63305411	14-12-88
US-A- 4284897	10-08-81	JP-C- 1184952 JP-A- 52135660 JP-B- 57048888 DE-A,C 2818941	15-07-81 27-11-82 23-10-82 09-11-82

For more details consult this issue's Official Journal of the European Patent Office, No. 17/93